

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-314183

(P2001-314183A)

(43)公開日 平成13年11月13日(2001.11.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 1/00	B 4 B 0 6 5
1/00		A 6 1 K 35/14	Z 4 C 0 8 7
// A 6 1 K 35/14		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00		37/04	
37/04		C 1 2 N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 12 頁)

(21)出願番号	特願2000-146392(P2000-146392)
(22)出願日	平成12年5月18日(2000.5.18)
(31)優先権主張番号	特願2000-53627(P2000-53627)
(32)優先日	平成12年2月29日(2000.2.29)
(33)優先権主張国	日本 (JP)

(71)出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72)発明者	海老名 卓三郎 宮城県仙台市青葉区広瀬町2-12
(74)代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀 Fターム(参考) 4B065 AA94X BA23 BB19 CA44 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 DA02 DA03 DA20 DA32 NA05 NA06 ZB26

(54)【発明の名称】 キラー活性を増強したリンパ球

(57)【要約】

【課題】 免疫調節剤(biological response modifier : B RM)活性化キラー細胞(B AK細胞)免疫療法の効果をより高めることができる、キラー細胞の細胞障害性が高められた、B RMによって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球やかかるリンパ球の製造方法を提供すること。

【解決手段】 末梢血から分取した単核細胞を固相化抗CD3抗体の存在下でインキュベーションした後、IL-2含有培地で培養し、次いでIL-2及びIFN- α で所定時間活性化処理する。所定時間の活性化処理として、1000単位/m1のIL-2と1000~2000単位/m1のIFN- α で約15分間の処理を行うことにより、ダウジ(Daudi)癌細胞に対する細胞障害活性が150溶解ユニット以上のリンパ球を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 末梢血から分取した単核細胞を固相化抗CD3抗体の存在下で培養した後、IL-2含有培地で培養し、次いでIL-2及びIFN- α で活性化処理することにより得られ、ダウディ癌細胞に対する細胞障害活性が、150溶解ユニット以上であることを特徴とする生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項2】 ダウディ癌細胞に対する細胞障害活性が、180溶解ユニット以上であることを特徴とする請求項1記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項3】 生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞が、生物製剤(BRM)によって活性化された $\gamma\delta$ T細胞及び/又はNK細胞であることを特徴とする請求項1又は2記載の生物製剤によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項4】 生物製剤(BRM)によって活性化された $\gamma\delta$ T細胞及び/又はNK細胞が、 β -エンドルフィン産生能を有するCD56陽性細胞であることを特徴とする請求項3記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項5】 β -エンドルフィン産生能を有するCD56陽性細胞が50%以上含まれていることを特徴とする請求項4記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項6】 生物製剤(BRM)を実質的に含まないことを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項7】 生物製剤(BRM)がIL-2及びIFN- α であることを特徴とする請求項6記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球。

【請求項8】 末梢血から分取した単核細胞を固相化抗CD3抗体の存在下でインキュベーションした後、IL-2含有培地で培養し、次いでIL-2及びIFN- α で所定時間活性化処理することを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の活性化されたキラー細胞を含むリンパ球の製造方法。

【請求項9】 IL-2含有培地での培養が、单球の共存下に行われることを特徴とする請求項8記載の活性化されたキラー細胞を含むリンパ球の製造方法。

【請求項10】 IL-2及びIFN- α による所定時間の活性化処理が、1000単位/m1のIL-2と1000～2000単位/m1のIFN- α で約15分間行う活性化処理であることを特徴とする請求項8又は9記載の活性化されたキラー細胞を含むリンパ球の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】進行性癌患者に対し延命効果をもち、患者のクオリティーオブライフ(QOL)を改善するための新しい養子免疫療法に用いることができる、癌細胞に対するキラー活性を増強したリンパ球とその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、抗癌治療の目標は一般に癌の治癒や癌組織の縮減に重点がおかれていたが、現在の医学は患者が身体的に良好な状態にあることに加えて、患者のQOLを維持する為の精神的ケアを重要視するようになってきている。癌治療における化学療法や放射線治療は癌細胞を殺傷するが、健全な細胞(特に骨髄細胞)をも殺傷するため、副作用を誘発したりQOLを低下させる。かかる状況の中で、副作用を誘発することなく、癌細胞のみを殺傷する免疫療法を開発する試みが最近活発に研究されている。

【0003】キラー細胞の有する細胞障害活性を利用して、癌細胞を殺傷する方法として知られている免疫療法として、リンホカイン活性化キラー(lymphokine activated killer cells: LAK)細胞を用いる養子免疫療法がローゼンベルグにより報告されている(Immunology Today 1988; 9: 58-62)。この養子免疫療法は、患者の末梢単核細胞からキラー細胞を分離し、インターロイキン-2(IL-2)とともに培養し、活性化された細胞をIL-2と共に患者体内に戻すという方法であるが、副作用があり満足できるものではなかった。次いで、癌組織からリンパ球を分離しIL-2で刺激し、活性化されたリンパ球を患者にIL-2と共に戻す癌浸潤性リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte: TIL)療法が報告された(J. Clin. Oncol. 1989; 7: 250-61, J. Immunol. 1989; 142: 4520-6, J. Immunol. 1991; 146: 1700-7)が、この療法も副作用があり満足できるものではなかった。また、癌特異的CD8陽性のキラー細胞を利用する細胞障害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocytes: CTL)療法と呼ばれる方法も報告されている(Jpn. J. Cancer Res. 1989; 50: 337-45)が、この療法も副作用の他に、CTLの処理に時間がかかる等の問題があった。本発明者も、生物製剤(biological response modifiers: BRM)活性化キラー細胞(BRM activated killer: BAK細胞)療法について報告(以下「前報」という)している(Biotherapy 1998; 11: 241-253)。このBAK細胞療法は、癌患者の末梢血からリンパ球を取り出し、癌細胞を特異的に障害する細胞を選択し、その細胞障害活性を高める処理をしたリンパ球を患者に戻すことによって、癌細胞の増殖を抑制し、また癌細胞を殺傷することにより、癌細胞に起因する症状を改善し軽減するものである。

【0004】Tリンパ球の表面に存在し、癌細胞等の表面にある抗原を認識するT細胞レセプター(T cell rece

ptor: TCR)には $\alpha\beta$ 鎖と $\gamma\delta$ 鎖があり、 $\alpha\beta$ 鎖を有する $\alpha\beta$ T細胞と、 $\gamma\delta$ 鎖を有する $\gamma\delta$ T細胞とが知られている。 $\alpha\beta$ T細胞は主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex: MHC)依存性であるが、 $\gamma\delta$ T細胞はMHC非依存性である。 $\alpha\beta$ 鎖と $\gamma\delta$ 鎖はともにTリンパ球細胞表面上でCD3蛋白複合体と非共有結合によって結合し、TCR-CD3複合体を形成することが知られている。可溶性の抗CD3抗体とIL-2により処理した従来のLAK細胞は多数の $\alpha\beta$ T細胞を含有し、癌細胞と正常な白血球の両方を殺傷するため、副作用を引き起こす。 $\alpha\beta$ T細胞は癌細胞のみならず健全な白血球細胞等に対しても細胞障害性を有するが、他方 $\gamma\delta$ T細胞は癌細胞に対してのみ細胞障害性を有するため、患者の末梢血から採取したT細胞のうち、 $\gamma\delta$ T細胞を選択し、その細胞障害活性をBRMで活性化したBAK細胞の濃度を高めることが肝要である。すなわち、BAK細胞療法においては、キラー細胞の細胞障害活性を高めると共に、癌細胞を特異的に傷害するキラー活性の比率を高めることが重要である。

【0005】前報において、癌細胞を特異的に傷害するキラー活性の比率を高めるには、あらかじめ抗CD3抗体をフラスコ内壁に固定した固相化抗CD3抗体を用いて、癌患者から採取したリンパ球を培養することが有効であることを、本発明者らは既に報告しており、この固相化抗CD3抗体を用いて処理したリンパ球には多くの $\gamma\delta$ T細胞とNK(ナチュラルキラー)細胞が含まれている。また本発明者らは、BRM活性化 $\gamma\delta$ T細胞が抗癌性のサイトカイン類(IFN- γ 、TNF- α 等)を生産し、これらIFN- γ 、TNF- α がBAK細胞の主要な細胞障害性サイトカイン類であること(Clin Cancer Res 3, 633-643, 1997)や、CD56陽性(CD56 $^{+}$)細胞はCD56陰性(CD56 $^{-}$)細胞よりも強い細胞障害活性を有すること(J Immunol Methods 136, 1-9, 1996)を既に報告している。

【0006】前報において報告した新しいタイプの養子免疫療法であるBAK細胞療法は、固定化された抗CD3抗体、IL-2及びIFN- α で活性化されたリンパ球を用いるものであり、これらの活性化されかつ増殖したリンパ球は多くのCD56陽性細胞から構成されており、CD56陽性のMHC-非依存性のキラー細胞である $\gamma\delta$ T細胞及びNK(ナチュラルキラー)細胞が約半分を占めている。NK細胞は数種類の標的細胞株に対する自然発生的な細胞障害性を媒介するCD16 $^{+}$ のリンパ球として定義され、CD56抗原の発現に基づき二つのサブセットに分類されている。このうちCD16 $^{+}$ CD56 $^{+}$ NK細胞は、CD16 $^{+}$ CD56 $^{-}$ NK細胞よりも強い細胞障害活性を有している。CD56抗原はMHC-非依存性細胞障害性を媒介するCD3 $^{+}$ Tリンパ球の小さなサブセット上でも発現される。前報においては、 $\gamma\delta$ T $^{+}$ CD56 $^{+}$ 細胞は $\gamma\delta$ T $^{+}$ CD56 $^{-}$ 細胞よりも

も強い細胞障害性を持つことを示した。 $\gamma\delta$ T細胞及びCD16陽性NK細胞のうちで、CD56陽性細胞が特に強いキラー細胞であることも示されている。かかるCD56抗原は神経細胞接着分子(neural cell adhesion molecule: NCAM)と同一物質であり、この神経系及びその他の組織の胚発達の間に種々の部位に発現するNCAMは、細胞表面上に5つのIgG様の領域を有することも知られている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らが前報において報告した前記BAK細胞免疫療法は有効な方法であったが、更に改善の余地がないとはいえた。本発明の課題は、BAK細胞免疫療法の効果をより高めることができる、キラー細胞の細胞障害性が高められた、BRMによって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球やかかるリンパ球の製造方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】前記BAK細胞免疫療法におけるBRMによるリンパ球中の $\gamma\delta$ T細胞とNK細胞の活性化は、IL-2を加えた培地中で約2週間培養し、最後にIL-2とIFN- α で再活性化することによってなされるが、BRMによる活性化の条件を改善することにより、前報に比べ細胞障害性が著しく改善されたBAK細胞を含むリンパ球が得られることがわかった。また、BRMによる活性化処理により増加するCD56陽性細胞が、癌等の患者の苦痛を和らげる効果を有する β -エンドルフィンを産生することを初めて見い出した。そして、前記細胞障害性が著しく改善されたBAK細胞を含むリンパ球を、かかるリンパ球を採取した進行性癌患者に投与したところ、患者に対し延命効果があること、QOLの向上に寄与すること、副作用がないこと、場合によっては原発性癌の消失や縮小効果があることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、末梢血から分取した単核細胞を固相化抗CD3抗体の存在下で培養した後、IL-2含有培地で培養し、次いでIL-2及びIFN- α で活性化処理することにより得られ、ダウディ癌細胞に対する細胞障害活性が、150溶解ユニット以上であることを特徴とする生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項1)や、ダウディ癌細胞に対する細胞障害活性が、180溶解ユニット以上であることを特徴とする請求項1記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項2)や、生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞が、生物製剤(BRM)によって活性化された $\gamma\delta$ T細胞及び/又はNK細胞であることを特徴とする請求項1又は2記載の生物製剤によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項3)や、生物製剤(BRM)によって活性化された $\gamma\delta$ T細胞及び/又はNK細胞が、 β -エンドルフィン産生能を有する

CD56陽性細胞であることを特徴とする請求項3記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項4)や、 β -エンドルフィン産生能を有するCD56陽性細胞が50%以上含まれていることを特徴とする請求項4記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項5)や、生物製剤(BRM)を実質的に含まないことを特徴とする請求項1~5のいずれか記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項6)や、生物製剤(BRM)がIL-2及びIFN- α であることを特徴とする請求項6記載の生物製剤(BRM)によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球(請求項7)に関する。

【0010】また本発明は、末梢血から分取した単核細胞を固相化抗CD3抗体の存在下でインキュベーションした後、IL-2含有培地で培養し、次いでIL-2及びIFN- α で所定時間活性化処理することを特徴とする請求項1~7のいずれか記載の活性化されたキラー細胞を含むリンパ球の製造方法(請求項8)や、IL-2含有培地での培養が、単球の共存下に行われることを特徴とする請求項8記載の活性化されたキラー細胞を含むリンパ球の製造方法(請求項9)や、IL-2及びIFN- α による所定時間の活性化処理が、1000単位/m1のIL-2と1000~2000単位/m1のIFN- α で約15分間行う活性化処理であることを特徴とする請求項8又は9記載の活性化されたキラー細胞を含むリンパ球の製造方法(請求項10)に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のBRMによって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球は、ダウディ(Daudi)癌細胞に対する細胞障害活性が150溶解ユニット以上、好ましくは180溶解ユニット以上であることを特徴とし、上記BRMとしては末梢血単核細胞(PBM C)に作用してその細胞障害活性を高めうるものであれば特に制限されないが、インターフェロンやインターロイキン等のサイトカイン類を例示することができ、具体的に、IL-2やIFN- α 等を挙げることができる。

$$\text{比放出率 (\%)} = \frac{\text{測定放出値 (c p m)}}{\text{最大放出値 (c p m)}} - \frac{\text{バックグラウンド (c p m)}}{\text{バックグラウンド (c p m)}} \times 100$$

【0016】本発明のBRMによって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球は、例えば、以下のようにして調製することができる。末梢血から分離したPBM Cを、培養器の内壁に固定した固相化抗CD3抗体の存在下でインキュベートし、TCRと会合して抗原認識複合体を形成するCD3(抗原)の抗CD3抗体との結合を利用して、特にCD56陽性の $\gamma\delta$ T細胞を培養器内壁に付着させ、次いでIL-2含有培地で培養し、T細胞やNK細胞、特にCD56陽性の $\gamma\delta$ T細胞やCD56陽性のNK細胞を増殖させた後、IL-2、IFN- α 等のBRMを用いて所定時間活性化処理することにより得る

【0012】また、上記キラー細胞としては、癌細胞等の細胞障害活性を有する細胞であれば特に制限されるものではないが、正常細胞を傷害することなく、癌細胞を特異的に傷害するキラー細胞が好ましい。かかる癌細胞を特異的に傷害するキラー細胞として、具体的に、TCR $\gamma\delta$ 鎖を有する $\gamma\delta$ T細胞や、IgG型抗体のFc部分に結合する細胞表面受容体として知られるCD16膜貫通型抗原を発現するNK細胞等を挙げることができ、これらの中でも β -エンドルフィン産生能を有するCD56陽性細胞、すなわちCD56陽性の $\gamma\delta$ T細胞やCD56陽性のNK細胞が好ましい。

【0013】本発明のBRMによって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球としては、CD56陽性の $\gamma\delta$ T細胞やNK細胞が50%以上含まれているリンパ球が、強い癌細胞特異的障害活性や β -エンドルフィン産生によるQOL改善の点から好ましく、また、活性化処理に使用したIL-2、IFN- α 等の生物製剤(BRM)が実質的に含まれていないリンパ球が副作用を抑制しうる点で好ましい。

【0014】また、前記「溶解ユニット」は以下のように定義される。エフェクター細胞とCr⁵⁶等の放射性物質で標識されたダウディ細胞又はK562細胞等の標的細胞とを接触せしめ、該標的細胞から放出される放射性物質の量[測定放出値(cpm)]と、該標的細胞に取り込まれた全放射性物質の量[最大放出値(cpm)]と、放射性物質測定環境下における放射性物質の検出量[バックグラウンド(cpm)]とをスペクトルガンマカウンター等でそれぞれ測定し、次式(数1)により比放出率(%)を算出する。1溶解ユニットは、 1×10^7 のエフェクター細胞が標的細胞からの比放出率30%を誘導する標的細胞の数として求められる。したがって、1溶解ユニットは、 1×10^7 のエフェクター細胞がその30%を殺傷することができる標的細胞数を意味することになる。

【0015】

【数1】

ことができる。そして、このようにして得られたリンパ球を洗浄し、活性化処理に用いたIL-2、IFN- α 等のBRMを実質的に除去しておくことが好ましい。また、上記培養増殖時に单球を共存させることにより、より細胞障害活性の強いキラー細胞を含むリンパ球を得ることができる。

【0017】上記活性化処理としては、ダウディ癌細胞等の標的細胞に対する細胞障害活性が150溶解ユニット以上となる処理であれば特に制限されるものでなく、使用するBRMの種類・組合せ、濃度、処理時間等を適宜選択することができる。例えば、活性化処理にBRM

としてIL-2とIFN- α を用いる場合について具体的に説明すると、1000単位/m1のIL-2と100~2000単位/m1のIFN- α で約15分間の活性化処理により、ダウディ癌細胞等の標的細胞に対する細胞障害活性が150溶解ユニット以上となるリンパ球を得ることができる。上記1000単位/m1のIL-2と1000単位/m1のIFN- α とを用いる場合、処理時間を15分より少し長くしてもよく、また、1000単位/m1のIL-2と2000単位/m1のIFN- α とを用いるときは、処理時間を15分より少し短くしてもよい。

【0018】前述した前報においては、1000単位/m1のIL-2と500単位/m1のIFN- α とで1時間活性化処理を行ったが、かかる活性化処理では、最大130溶解ユニットのダウディ癌細胞等の標的細胞に対する細胞障害活性しか得られないが、上記のように、1000単位/m1のIL-2と1000単位/m1のIFN- α で15分間活性化処理すると溶解ユニット200以上の本発明のリンパ球を、1000単位/m1のIL-2と2000単位/m1のIFN- α で15分間活性化処理すると溶解ユニット180程度の本発明のリンパ球を得ることができる。なお、このような処理濃度と処理時間を変えた活性化処理により、細胞障害活性が上記のように大きく変化する理由は定かではないが、BRMにより活性化されたBAK細胞は、当初約20%のCD56陽性細胞を含有するに過ぎないが、2週間培養・増殖することによってCD56陽性細胞が約50%あるいは50%以上に増えたこともその一因と考えられる。

【0019】

【実施例】以下に、実施例を掲げて本発明を具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 [BAK細胞活性を高めたリンパ球の製造]

(材料) BAK細胞活性を高めたリンパ球の製造には、以下の材料を使用した。OKT3クローン(オルト ファーマシュチカル、アメリカ)から精製された抗CD3モノクローナル抗体は、ヤンセン協和(東京)から購入したものを、遺伝子組換え大腸菌で製造したヒトIL-2(rhIL-2)は塩野義製薬(東京)から購入したものを、ヒト天然IFN- α は、住友製薬(大阪)から購入したものを、それぞれ用いた。

【0020】(BAK細胞活性を高めたリンパ球の調製法)複数の進行性癌患者から採取した末梢血20m1をヘパリン処理した後、フィコール-パーク密度勾配遠心分離(350×g、25分)して、中間に層状になったリンパ球を含む末梢血单核細胞(PBMC)画分を分取した。得られたPBMC 3~5×10⁷個を、10%のヒトAB血清とrhIL-2を700単位/m1で含む30m1のRPMI1640+7培地(日研生物医学研

究所社製)に加えた後、抗CD3抗体で被覆された225cm²培養フラスコ中で一晩インキュベートした。次いで、30m1のPBMCを上記フラスコに添加し、CO₂雰囲気下37℃で2日間培養し、さらにRPMI1640+7培地を60m1加え、さらに1~2日培養した。

【0021】培養物を3つのフラスコに分け非接着性細胞を2~3日培養した。175単位/m1のIL-2と2%のヒトAB血清を含むHyMedium930B-10(ニプロ社製)1リットルを含むガス透過性のバッグに移し、2~3日間培養して2つのバッグに分け、これをさらに2~3日間培養して4つのバッグに分けた。殺菌試験とエンドキシンアッセイを行い問題の無いことを確認した後、1000単位/m1のIL-2と1000単位/m1のIFN- α によって15分間活性化処理を行った。0.1%のヒトアルブミンを含む生理食塩水中で遠心分離することによって2回洗浄し、IL-2及びIFN- α を除去し、得られた0.5~1.0×10¹⁰のリンパ球を2.5%のヒトアルブミンを含む生理食塩水200m1を含む輸液バッグに入れた。この0.5~1.0×10¹⁰のリンパ球が、1回のBAK細胞療法において1時間かけて静脈に点滴投与される量である。

【0022】実施例2 [活性化処理の条件]

(試料の調製) IL-2とIFN- α を用いた活性化処理条件(IFN- α 濃度、処理時間)について検討した。固相化抗CD3抗体処理に続くIL-2存在下での2週間の培養・増殖後のPBMCを、1000単位/m1のIL-2と、1000単位/m1又は2000単位/m1のIFN- α で、15分間又は30分間活性化処理を行い、得られた6種類のBAKを含むリンパ球をエフェクター細胞とし、ダウディ細胞を標的細胞とする細胞障害活性について調べた。なお、対照としては、IL-2とIFN- α を添加することなく、15分間インキュベーションしたものを用いた。

【0023】(細胞障害活性の測定)上記活性化処理により得られたエフェクター細胞(2×10⁶)を、10%のヒト血清を含むRPMI1640培地1m1を入れた24ウェルの平底プレートでインキュベートした。37℃で24時間インキュベートした後、エフェクター細胞をRPMI1640培地で3回洗浄した後、10%子牛血清(FBS)を含むRPMI1640培地に再懸濁した。一方、標的細胞であるダウディ細胞を、0.5m1のクロム酸ナトリウム(Cr⁵⁶、比活性5mCi/m1; ICN, CostaMesa, CA)を用い37℃で90分間で標識し、10%子牛血清を含むRPMI1640培地で3回洗い、新しい培地に再懸濁し、1×10⁴/ウェルのエフェクター細胞が予め加えられている96ウェルU底プレート(ベクトンディッキンソンラボ社製)に所定の標的細胞濃度となるように加えた。96ウェルU底プレートを50×gで遠心分離し、上澄を各ウェルから回収

レスペクトルガンマカウンター (Packard Instrument, Downers Grove, IL) で、標的細胞から放出される放射性物質の量 [測定放出値 (cpm)] を測定した。また、標的細胞に取り込まれた全放射性物質の量 [最大放出値 (cpm)] は標的細胞を 3% トリトン X-100 (シグマ社製) でインキュベートした後に測定した。そして、放射性物質測定環境下における放射性物質の検出量をバックグラウンド (cpm) とし、前記比放出率 (%) の式 (数 1) より算出した比放出率が 30% となる標的細胞数を求め、その値を 1×10^7 のエフェクター細胞当たりの殺傷標的細胞数に換算、すなわち 1000 倍して溶解ユニット値とした。結果を図 1 に示す。

【0024】図 1 から明らかなように、1000 単位/m¹ の IL-2 と 1000 単位/m¹ の IFN- α を用いて 15 分間活性化処理したもの、及び、1000 単位/m¹ の IL-2 と 2000 単位/m¹ の IFN- α を用いて 15 分間活性化処理したものは、溶解ユニットが、それぞれ 180 度及び 200 以上であり、極めて高いことがわかった。一方、1000 単位/m¹ の IL-2 と 1000 単位/m¹ 又は 2000 単位/m¹ の IFN- α を用いて 30 分間活性化処理したものは、1000 単位/m¹ の IL-2 のみを用いて 15 分間又は 30 分間活性化処理したものと同程度の細胞障害活性を示し、同濃度で 15 分間活性化処理したものに比べて細胞障害活性が低かった。

【0025】実施例 3 [リンパ球の培養・増殖特性及び性状]

(材料) NK 細胞、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD56 陽性細胞を定量するために、それぞれフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識した FITC 抗 CD16 モノクローナル抗体、FITC 抗 TCR $\alpha\beta$ モノクローナル抗体、FITC 抗 TCR $\gamma\delta$ モノクローナル抗体、フィコエリトリン (PE) で標識した PE 抗 CD56 モノクローナル抗体を用い、これらモノクローナル抗体はベクトンディッキンソン (マウンテンビュー、カリホルニア) から購入した。また、細胞内サイトカイン分析のためのペリジニンクロロフィル蛋白標識化抗 CD3 抗体及び PE 標識化抗 IFN- γ モノクローナル抗体もベクトンディッキンソンから購入した。

【0026】(フローサイトメトリー) 細胞の一定量を氷上で 30 分間適量の FITC 又は PE で標識したモノクローナル抗体で染色した。細胞を非標識化モノクローナル抗体と 30 分間氷上でインキュベートし、冷たい RPMI 1640 で洗浄し、それから FITC 結合をしたヤギ F(ab')₂ 抗マウス免疫グロブリン抗体又は抗ラット免疫グロブリン抗体 (Cappel, Durham, NC) を用いて染色した。染色したこれらの細胞を 2 回洗浄し、0.5 m¹ の冷たい RPMI に再度懸濁し、FACScan フローサイトメーター (ベクトンディッキンソン社製) により分析した。イソタイプ適合モノクローナル抗体を

ネガティブコントロールとして用いた。IFN- γ 生産性 $\gamma\delta$ T 細胞は前報 (Biotherapy 11, 241-53, 1998) に記載した方法と同様フローサイトメトリー法 (Flow cytometry) により測定した。

【0027】(CD56 陽性細胞と CD56 陰性細胞の単離) 末梢血单核細胞 (PBMC) から、CD56 陽性及び CD56 陰性リンパ球を、マイクロビーズ (Miltenyi Biotech Inc 社製) を用いたガイセルハルトらの方法 (Geiselhart et al. Natural Immunity 15, 227-33, 1996) により単離した。簡単に説明すれば、フィコール一パーカー (Ficoll-Paque) 密度勾配遠心分離法により末梢血から PBMC を分離し、得られた PBMC 中の CD56 陽性細胞を、抗 CD56 抗体と結合した磁気マイクロビーズで被覆し、磁気カラムを用いて陽性的に選択し溶出した。また、CD56 陰性細胞は磁気的に消費されそのままの細胞として分離された。これらの CD56 陽性細胞及び CD56 陰性細胞の純度は、FACS (fluorescence activated cell sorter : 蛍光活性化セルソーター) 分析によりそれぞれ 98% であることがわかった。

【0028】(IL-2 存在下 2 週間の培養による CD56 陽性細胞等の増加) 後記する表 3 に示される癌患者 3 名から末梢血を数ヶ月にわたり複数回採取し、IL-2 存在下 2 週間培養する実施例 1 記載の方法で活性化されたキラー細胞を含むリンパ球を調製した。そして、培養の前後における NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD56 陽性細胞の増加について調べた。結果を図 2 に示す。図 2 に示されるように、患者番号 1 においては、 $\gamma\delta$ T 細胞と CD16 陽性細胞の両細胞数が培養によって増加し、患者番号 6 においては、 $\gamma\delta$ T 細胞の数が増加し、患者番号 11 においては、CD16 陽性細胞の数が増加することの他、CD56 陽性細胞の数は全ての患者において増加することや、BAK 細胞の主な集団 (ポピュレーション) は CD56 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞、CD56 陽性 NK 細胞等の CD56 陽性細胞からなることがわかった。

【0029】また、実施例 1 における IL-2 存在下の 2 週間の培養時における単球共存の細胞障害活性や CD56 陽性細胞数に及ぼす影響について調べた。単球非共存下での培養とするために、培養器内壁に付着した細胞を除去した状態で培養する以外は、単球共存下の培養である実施例 1 と同様に行った。また、細胞障害活性はダウディ細胞に加えて K-562 細胞を用いる以外は実施例 2 と同様に行った。結果を表 1 に示す。表 1 から、末梢血リンパ球中の CD56 陽性細胞を増殖するためには、培養する際に単球を共存させることが好ましいことや、BAK 細胞を付着性単球の非共存下で培養すると、K-562 細胞 (NK 細胞の標的細胞) 及びダウディ細胞に対する細胞障害活性は増加しないことがわかった。

【0030】

【表 1】

細胞集団	単球(+) BAK細胞	単球(-) BAK細胞
標的細胞		
細胞障害活性 (溶解ユニット)	K-562 Daudi	258.1 1088.1
CD56陽性細胞 (%)		39.9 9.7

【0031】(β-エンドルフィンの分泌に関する新しい知見)また、図2からわかるように、BAK細胞は培養前約20%のCD56陽性細胞を含有するが、2週間培養するとCD56陽性細胞は約50%に増加し、BAK細胞の多くはCD56陽性細胞であることがわかった。また、前報において、CD56陽性(CD56⁺)細胞はCD56陰性(CD56⁻)細胞よりも強い細胞障害活性を有することを報告した。他方、β-エンドルフィンはNK細胞活性を増進し、NK細胞及びヒト末梢血リンパ球によるIFN-γの生産を増進する。そこで、CD56陽性細胞がβ-エンドルフィンを産生するかどうかについて調べた。

【0032】(β-エンドルフィンの分析法)リンパ球の培養上澄中のβ-エンドルフィンは、ラジオイムノアッセイ(RIA; INCSTAR Corp. 社製)により分析した。培養上澄をウサギ抗β-エンドルフィン血清と16~24時間4°Cでインキュベートした。[¹²⁵I]でラベルしたβ-エンドルフィンを加え、さらに16~24時間4°Cでインキュベートした。相分離はヤギ抗ウサギ抗体の事前沈殿複合体で20分間4°Cにて行った。その溶液を760×gで20分遠心分離し、その上澄を捨て、それぞれの試験管中の沈殿物をガンマシンチレーションカウンターで測定した。このβ-エンドルフィン抗体の交差反応活性はヒトβ-エンドルフィン中で100%であり、エンケファリン(enkephalin)、ACTH及びバソプレッシン中では0.01%以下であった。

【0033】(CD56陽性細胞のβ-エンドルフィンの産生)CD56陽性細胞及びCD56陰性細胞は、前記マイクロビーズ法によって末梢血単核細胞(PBM C)から単離した。次いで、2.5mlの10⁶細胞を RPMI 1640培地で血清を添加せずに16時間培養した培養上澄におけるβ-エンドルフィンを、前記β-エンドルフィンの分析法により測定した。結果を表2に示す。表2に示されるように、CD56陽性細胞だけが8pg/mlのβ-エンドルフィンを産生した。この産生量は、10⁹個のCD56陽性細胞の場合、20ngのβ-エンドルフィンが生産されることに相当する。通常のヒトの血漿中のβ-エンドルフィンは5.8±1.1pg/mlであり、本発明のBAK細胞療法に用いられるBAK細胞によって生産されるβ-エンドルフィンは20ngとなるので、生体にとって有意の量といえる。

【0034】
【表2】

細胞(10 ⁶ /2.5ml)	上澄中のβ-エンドルフィン
新鮮な末梢血単核細胞	<5pg/ml
CD56陰性細胞	<5pg/ml
CD56陽性細胞	8pg/ml

【0035】上記のように、CD56陽性細胞とCD56陰性細胞と比較した結果、CD56陽性細胞のみがβ-エンドルフィンを産生することを初めて明らかにした。CD56陽性細胞はその細胞膜表面にNCAMをもち、脳ホルモンのβ-エンドルフィンを産生することから、神経-免疫-エンドクリン(neuro-immune-endocrin e: NIE)系に直接的に関与する、多機能的NIE細胞であると考えられる。かかるCD56陽性細胞が多機能NIE細胞であることはこれまで全く知られていなかった。このように、CD56陽性細胞によるβ-エンドルフィンの生産はBAK細胞療法によって誘起される一連の抗癌反応に重要な役割を果たしていると考えられる。他方、β-エンドルフィンは非常に重要な鎮痛・鎮静作用を示す。したがって、BAK細胞療法を始めて2~3週間後に患者が満足すべきQOLを報告したのはこれが

理由であると推察される。

【0036】実施例4 [臨床試験]

本発明のBAK細胞活性を高めた自己リンパ球を用いたBAK細胞療法を施した患者は、余命が数ヶ月と予測される化学治療を拒否した13人の進行性癌患者、及び手術を受けた後の転移の防止を希望した4人の患者である。前報において、IFN-γ生産性のγδT細胞の割合が1%以下の進行癌患者はBAK細胞治療の対象にならないことから、全ての患者のIFN-γ生産性のγδT細胞の割合が1%以上であることかどかを確認した。表3に、患者の性別、年齢、原発病巣、転移病巣、IFN-γ生産性のγδT細胞の割合を示した。

【0037】

【表3】

患者番号	性別	年齢	原発疾患	転移疾患	IFN- γ 活性性 $\gamma\delta$ T細胞 (%)
1	男性	66	腎細胞癌(手術後)	肺	8.66
2	男性	45	肺臓の血管肉腫(手術後)	肺 肝臓	3.81
3	女性	43	乳癌(手術後)	骨	13.47
4	女性	50	乳癌(手術後)	リンパ節	5.36
5	女性	52	乳癌(手術後)	子宮	5.15
6	女性	62	甲状腺癌(手術後)	首	5.46
7	男性	63	結腸癌(手術後)	十二指腸	3.94
8	男性	62	肺癌(手術不能)	-	1.41
9	男性	52	結腸癌(手術後)	肝臓	15.23
10	男性	61	結腸癌(手術後)	結腸 腹膜	1.84
11	女性	54	結腸癌(手術後)	肝臓 肺	5.79
12	女性	38	乳癌(手術後)	骨	8.05
13	女性	69	腎細胞癌(手術後)	肺	2.96
14	男性	39	直腸癌	-	測定せず
15	男性	55	結腸癌	-	11.46
16	女性	46	乳癌	-	6.77
17	男性	66	舌癌	-	3.48

【0038】インフォームドコンセントを与えてから、通院によるBAK細胞治療の対象とした。平均 6×10^9 の本発明のBAK細胞を1時間かけて月1回又は2週間に1回点滴注射した。BAK細胞治療の結果を表4に示す。全ての患者の行動状態(performance status)はカルノフスキー指標で80%以上であった。また表4に示されているように、2週間培養することによって患者17人全てのPBMC中のCD56陽性細胞数が増加することがわかった。BAK細胞治療の間中、癌マーカーとしての免疫抑制性酸性蛋白(IAP)及びQOLマーカーとしてフェーススケールを測定し記録した。表2及び図3に示されるように、たとえ癌マーカー蛋白(IAP)が増加した場合でも、全ての患者のQOLは満足な状態であるか改善された。番号1の患者の場合、図2に示されるように、培養によって $\gamma\delta$ T細胞及びNK細胞(CD16陽性細胞)の数が増加した。肺への転移癌の大きさは像分析の結果3年間変化せず、患者の全体的状況は大変良好であった(図3)。番号10の患者の場

合、図2に示されるように、培養によって $\gamma\delta$ T細胞及びCD56陽性細胞の数が増加した。番号10の患者は硬性胃癌に冒されていたが2週間に一度飛行機で札幌から通院することができた。このことは、全般的に良好なQOLが1ヶ月以上維持できたことを示している(図3)。この患者は免疫療法の開始した後1ヶ月後、手術した後3ヶ月後に死亡したが、死亡の1ヶ月前まで多くの好きな活動に参加していた。図3に示すように、BAK細胞治療が細菌汚染のためできなくなった7月、番号5の患者の雰囲気は悪くなった。番号8の患者の場合、図2に示されるように、培養によってNK細胞(CD16陽性細胞)及びCD56陽性細胞の数が増加した。番号8の患者は手術不可能な肺癌にかかっていたが、BAK細胞治療を始めてからCT像分析によれば癌が消失した。

【0039】

【表4】

患者番号	培養下における OK456陽性細胞 の増加	最大免疫抑制性 酸性糖蛋白質 (μg/ml)	行動状態 (カルノフ スキー指標)	フェーススケール (QOL指標)		BAK療法 開始から の月数	固形癌 治療効果 判定
				治療前	治療後		
1	+	1000	90%	5	↗	4	39死出 長期不変
2	+	1170	80%	4	↗	2	37死出 長期不変
3	+	540	80%	6	↗	5	33 長期不変
4	+	360	100%	6	↗	3	24 長期不変
5	+	420	80%	6	↗	2	21 長期不変
6	+	450	100%	4	→	4	20 長期不変
7	+	860	90%	6	↗	2	20 長期不変
8	+	520	100%	2	↗	1	19 著効
9	+	860	90%	検査せず		19死出	不変
10	+	900	80%	4	→	4	17死出 不変
11	+	770	80%	6	→	6	16死出 不変
12	+	580	80%	7	↗	3	13 長期不変
13	+	480	100%	4	↗	1	12 著効
14	+	520	100%	検査せず		46	再発なし
15	+	290	100%	6	→	6	37 再発なし
16	+	330	100%	4	↗	3	31 再発なし
17	+	500	100%	4	↗	3	18 再発なし

【0040】17人全ての患者の行動状態はカルノフスキーの指標で80%以上であり、彼等は2週間に1回の割合で通院した。番号1～7及び9～13の患者の場合、原発性癌が除去されたにも拘わらず、多くの手術不可能な転移癌があった。これらの患者は2～3月しか生存出来ないと判断される状態であったが、16月以上に亘ってBAK細胞治療を受けた。これは、BAK細胞治療が進行癌患者に対し副作用の無い延命効果があることを意味する。これら番号1～7及び9～13の患者の場合、症像分析(CT及び/又はMRI)によれば、癌の大きさは変化しなかった。したがって、これらの患者に対するBAK細胞療法は、従来の化学療法で用いられる基準からすれば効果なしと判定される。しかし、これらの患者の行動状態(performance status)は、カルノフスキー指標によれば80%以上であり、彼等のQOL指數は10段階のフェーススケールを使った評価によれば維持されたか改善された。

【0041】そこで、以下の新しい判定基準を導入することにした。従来の固体癌の化学療法による効果判定では病巣像が消失し、4週間以上持続した場合を「著効」(CR)、病巣面積が50%以上の縮小が4週間以上持続した場合を「有効」(PR)、病巣面積が50%未満縮小、又は25%以内増大が4週間以上持続した場合を「不变」(NC)、病巣面積が25%以上増大した場合を「進行」(PD)としており、画像上腫瘍の大きさが不变であれば治療の効果がないとされてきた。しかし、癌組織が存在しても副作用がなく、QOLが良好な状態に維持されているならば患者にとって問題がないことか

ら、免疫療法では癌組織を無理矢理殺傷することはしないため、BAK細胞治療の効果判定基準として新しくPRとNCの間に病巣面積が50%未満縮小、又は25%以内増大が6ヶ月以上続く場合として「長期不变」(prolonged NC)を加えた。この判定基準を加えた番号1～13の患者の固体癌治療効果の判定結果を表4に示す。病巣の画像が消失した番号8及び番号13の患者につきCRの例が2例、番号1～7及び12の患者につきprolonged NCの例が8例となり、BAK細胞治療の効果がより一層明確となった。また、番号14～17の手術後の転移予防のためにBAK細胞治療を行った4名の患者については、癌転移の無い期間がそれぞれ46、37、31及び18月続いた。このことは、BAK細胞治療が癌転移予防効果を有することを意味する。

【0042】表4及び図3のヒト免疫抑制性酸性蛋白質(IAP)はヒト血清α1-酸性糖蛋白質の一つであり、癌マーカー蛋白質である。IAPの血清濃度はヤギ抗ヒトIAP血清抗体を用いる单一放射免疫拡散法により測定した。精製されたIAPを用いた検量線は30μg/mlと1500μg/mlの間で直線であった。また、表4及び図3中のフェーススケールとは、図4に示されるように、異なったムードを表す順番に並べた10枚の絵である。目、眉毛、及び口の微妙な変化が少しずつ違ったムードを表している。その顔はムードが悪い順に1～10の番号が付されており、1が最も良いムードであり、10は最も良くないムードである。試験官がこれらの顔を指差して患者に「これらの顔は最初の大変幸福なものから最後の大変悲しいものまであります。今日

のあなたの気持ちを最も良く表している顔を指差してください。」といって患者に指差すものをムードとして採用する。

【0043】

【発明の効果】本発明の生物製剤（B R M）によって活性化されたキラー細胞を含むリンパ球は、CD系の各種レセプターやサイトカインの免疫系における相互作用の解明、癌治療の基礎的研究に有用であるばかりでなく、癌患者に投与することにより延命効果があり、患者のQOLを向上させることができ、しかも副作用が無いので、新しい免疫療法を可能とする。

【図面の簡単な説明】

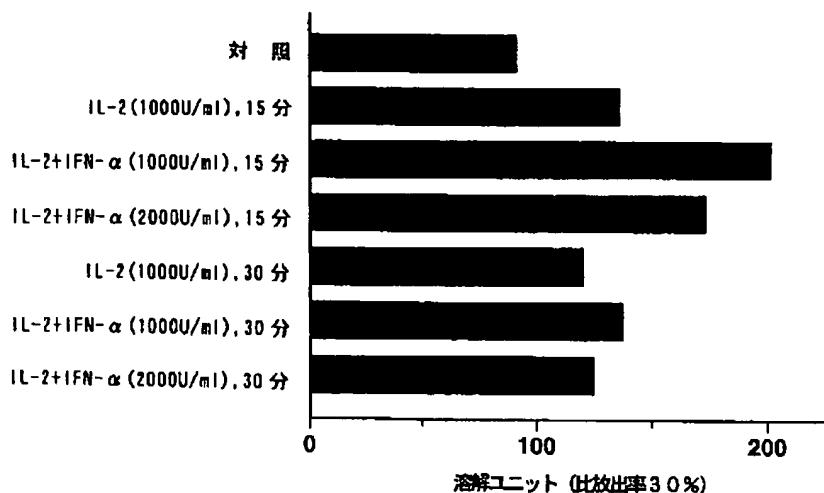
【図1】IL-2とIFN- α を用いた活性化処理における細胞障害活性の程度を溶解ユニットで示した図である。

【図2】末梢血由来のリンパ球をIL-2存在下に培養したときのNK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD56陽性細胞の細胞数の変化を示す図である。

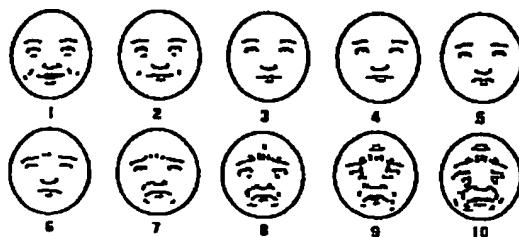
【図3】本発明のリンパ球を用いて治療した患者の経過を示す図である。

【図4】QOLを測定するために用いたフェーススケールの図である。

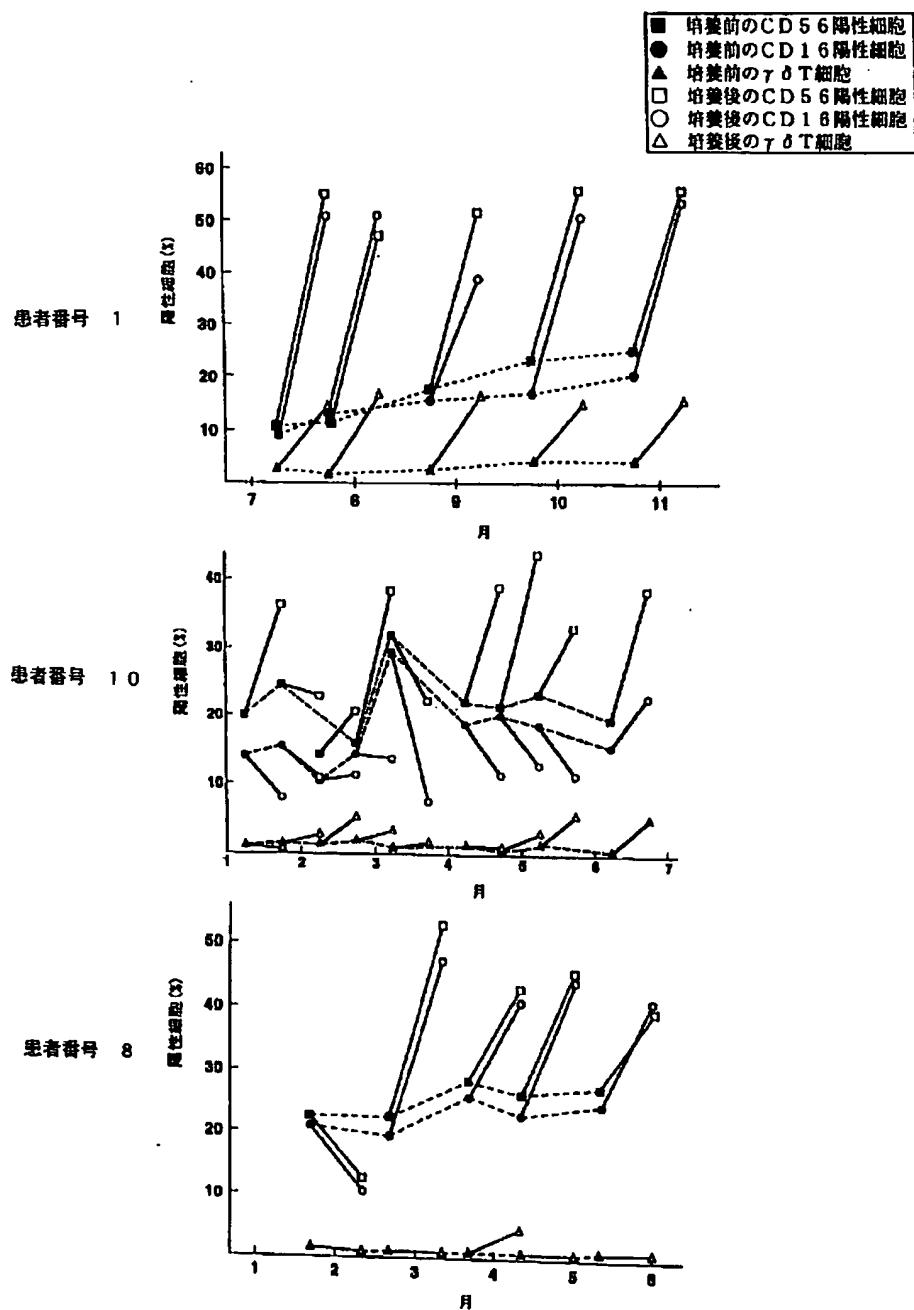
【図1】



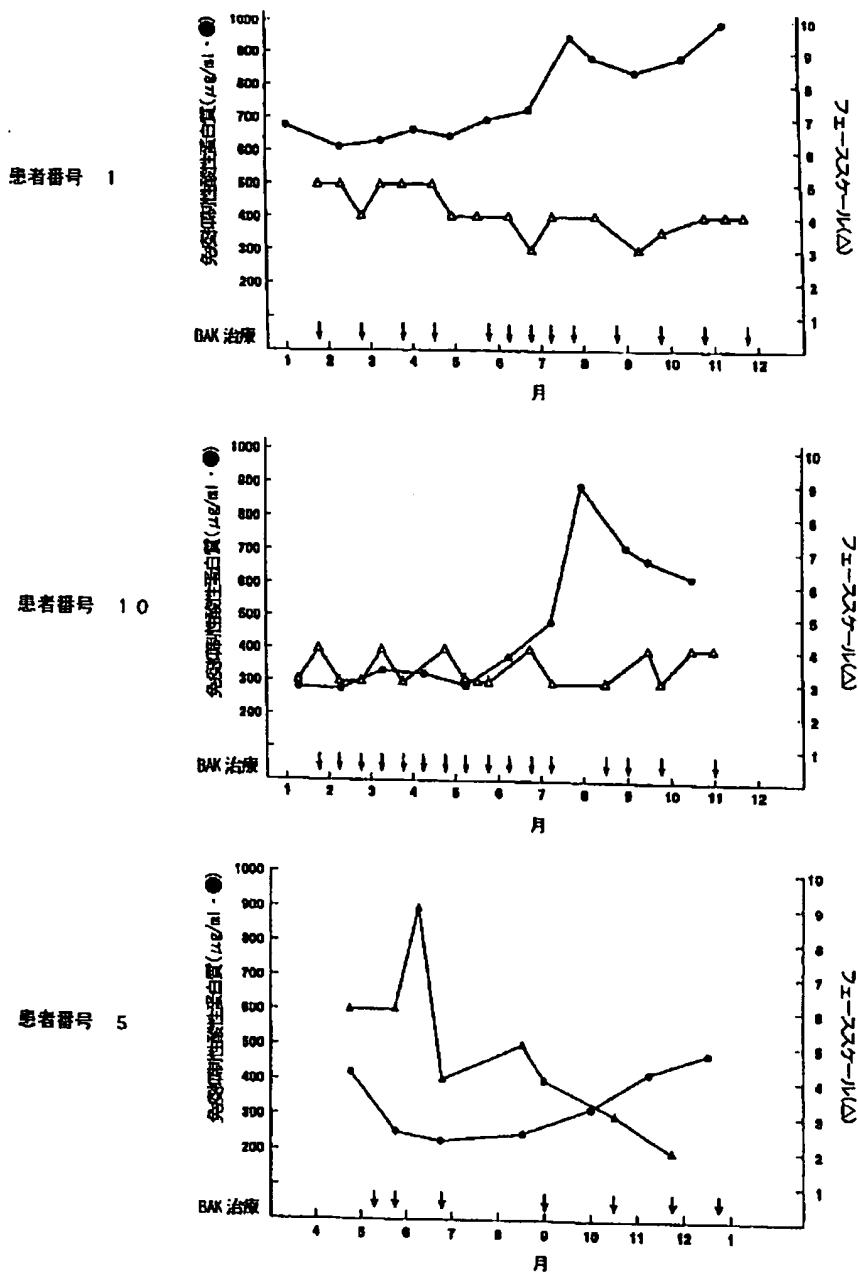
【図4】



【図2】



【図3】



DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014370589

WPI Acc No: 2002-191292/200225

XRAM Acc No: C02-059225

Biological response modifier activated killer cell produced by culturing mononuclear cell of peripheral blood in presence of solidified anti-CD3 antibody, interleukin (IL)-2, and activating using IL-2 and interferon-alpha

Patent Assignee: KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN (KAGA-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicant No	Kind	Date	Week
JP 2001314183	A	20011113	JP 2000146392	A	20000518	200225 B

Priority Applications (No Type Date): JP 200053627 A 20000229

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 2001314183 A 12 C12N-005/06

Abstract (Basic): JP 2001314183 A

NOVELTY - Mononuclear cell extracted from peripheral blood is initially cultured in presence of solidified anti-CD3 antibody, and then cultured in culture medium having interleukin (IL)-2. The resulting cell is activated by IL-2, interferon alpha to obtain biological response modifier (BRM) activated killer (BAK) cell containing lymphocyte (I). (I) has Daudi cancer cell damaging activity of more than 150 dissolution units.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for manufacturing (I) which involves incubating mononuclear cell extracted from peripheral blood of patient in the presence of solidified anti-CD3 antibody, and then culturing it in IL-2 containing culture medium. Subsequently the cells are activated by IL-2 and interferon (IFN)-alpha for a predetermined time.

ACTIVITY - Cytostatic.

MECHANISM OF ACTION - Cell therapy. No supporting data is given.

USE - (I) is used in adaptive immunotherapy for killing cancer cells in a patient.

ADVANTAGE - (I) is useful for killing cancer cells and also for elucidating the interaction of immune system to various kinds of receptors of CD type, and for research in cancer biology.

pp: 12 DwgNo 0/4

Title Terms: BIOLOGICAL; RESPOND; MODIFIED; ACTIVATE; KILL; CELL; PRODUCE; CULTURE; MONONUCLEAR; CELL; PERIPHERAL; BLOOD; PRESENCE; SOLIDIFICATION; ANTI; ANTIBODY; INTERLEUKIN; ACTIVATE; INTERFERON; ALPHA

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-005/06

International Patent Class (Additional): A61K-035/14; A61P-035/00; A61P-037/04; C12N-001/00

File Segment: CPI

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.